



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: Asahara et al.	
	Art Unit: 1645
Application No.: 10/772,271	Examiner: [to be assigned]
Filing Date: February 6, 2004	Atty. Docket: US-107
Title: Genes involved in polysaccharide production and utilization thereof	

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119 IN UTILITY APPLICATION

Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

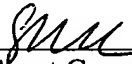
Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), filed in a foreign country within one (1) year prior to the filing of the above-referenced United States utility patent application (35 U.S.C. § 172):

Country	Priority Document Appl. No.	Filing Date
Japan	2002-32075	February 10, 2003

A certified copy of each listed priority document is submitted herewith. Prompt acknowledgment of this claim and submission is respectfully requested.

Respectfully submitted,



Shelly Guest Cermak
Reg. No. 39,571

Date: April 27, 2004
PTO Customer Number: **000038108**
Ajinomoto Corporate Services, LLC
1120 Connecticut Avenue
Ste. 1010
Washington, D.C. 20036
202.457.0284

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 2 月 1 0 日
Date of Application:

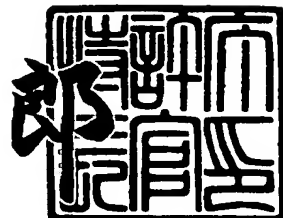
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 3 2 0 7 5
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 3 2 0 7 5]

出 願 人 味の素株式会社
Applicant(s):

2 0 0 3 年 7 月 1 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-B0649

【提出日】 平成15年 2月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 多糖類生成に関与する遺伝子及びその利用

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

【氏名】 浅原 貴之

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

【氏名】 安枝 寿

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】**【予納台帳番号】** 012092**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 要約書 1**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 多糖類生成に関与する遺伝子及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の (A) ~ (D) のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

(C) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

【請求項 2】 下記の (a) ~ (d) に示す DNA である請求項 1 に記載の DNA。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA または同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

(c) 配列番号 3 に記載の塩基配列を有する DNA。

(d) 配列番号 3 に記載の塩基配列を有する DNA または同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

【請求項 3】 メチロフィラス属細菌の染色体に由来することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の DNA。

【請求項 4】 請求項 1 に記載の遺伝子が導入され、多糖類生成能が向上したメタノール資化性細菌。

【請求項 5】 メチロフィラス属細菌である請求項 4 に記載の細菌。

【請求項 6】 請求項 4 又は 5 に記載の細菌をメタノールを主要炭素源とする培地に培養し、同培地又は細菌細胞中に多糖類を生成、蓄積させ、同培地又は細胞から多糖類を採取することを特徴とする多糖類の製造方法。

【請求項 7】 染色体上の遺伝子であって、かつ、請求項 1 又は 2 に記載の DNA と同一の塩基配列を有する遺伝子、又は同 DNA と相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、多糖類生成能が低下したメタノール資化性細菌。

【請求項 8】 メチロフィラス属細菌である請求項 7 に記載の細菌。

【請求項 9】 請求項 7 又は 8 に記載の細菌であって、かつ、多糖類以外の目的物質を産生する細菌をメタノールを主要炭素源とする培地に培養し、同培地又は細菌細胞中に目的物質を生成、蓄積させ、同培地又は細胞から目的物質を採取することを特徴とする、目的物質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物工業に関連したものであり、微生物の多糖類生成に関与する遺伝子とその利用法に関するものである。その遺伝子の利用は、一方で、微生物による有用多糖類の生産性を向上させ、他方で、微生物が副生する不要な多糖類合成を抑制し、その微生物が産生する目的物質の生産性を向上させ、目的物質の取得を容易にさせる。

【0002】

上記製造法は、特に、C1化合物、即ち、メタノールなどの炭素原子 1 個を有する化合物を資化する微生物での利用が有用である。

【0003】

【従来の技術】

メチロフィラス属細菌での多糖類生成に関しては、B. Southgateらは、メタノール資化性細菌メチロフィラス・メチロトロファス (Methylophilus methylotrophus) が菌体外に多糖を生産することを報告している (非特許文献 1)。しかしながら、メチロフィラス属細菌の多糖類生成に関与する遺伝子の構造については全く知られていない。

【0004】

【非特許文献 1】

J. Gen. Microbiol., 135, pp. 2859-2867 (1989)

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、メチロフィラス属細菌の多糖類生成に関与する遺伝子を取得し、その遺伝子を利用してC1化合物からの多糖類の生産性を向上させる手段、あるいは、不要となる多糖類生成を抑制し、目的物質の生成収率を向上させる手段を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、メチロフィラス・メチロトロファスの遺伝子群を解析する過程で、そのゲノム内に、多糖生成に関与する遺伝子群、即ち、「gtfA」遺伝子、及び「manC」遺伝子を見出した。そして、当該遺伝子を破壊することで、宿主のメチロフィラス・メチロトロファスの産生する多糖類の量が減少することを確認し、本発明を完成するに至った。

【0006】

すなわち本発明は、以下のとおりである。

(1) 下記の(A)～(D)のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA

。

(A) 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

(C) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

(2) 下記の(a)～(d)に示すDNAである(1)に記載のDNA。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAまたは同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(c) 配列番号 3 に記載の塩基配列を有する DNA。

(d) 配列番号 3 に記載の塩基配列を有する DNA または同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

(3) メチロフィラス属細菌の染色体に由来することを特徴とする (1) 又は (2) に記載の DNA。

(4) (1) に記載の遺伝子が導入され、多糖類生成能が向上したメタノール資化性細菌。

(5) メチロフィラス属細菌である (4) に記載の細菌。

(6) (4) 又は (5) に記載の細菌をメタノールを主要炭素源とする培地に培養し、同培地又は細菌細胞中に多糖類を生成、蓄積させ、同培地又は細胞から多糖類を採取することを特徴とする多糖類の製造方法。

(7) 染色体上の遺伝子であって、かつ、(1) 又は (2) に記載の DNA と同一の塩基配列を有する遺伝子、又は同 DNA と相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、多糖類生成能が低下したメタノール資化性細菌。

(8) メチロフィラス属細菌である (7) に記載の細菌。

(9) (7) 又は (8) に記載の細菌であって、かつ、多糖類以外の目的物質を産生する細菌をメタノールを主要炭素源とする培地に培養し、同培地又は細菌細胞中に目的物質を生成、蓄積させ、同培地又は細胞から目的物質を採取することを特徴とする、目的物質の製造方法。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】

<1> 本発明の DNA

本発明の DNA は、下記の (A) ~ (D) のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA である。

(A) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸の

置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

(C) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

【0009】

以下、上記 (A) 又は (B) のタンパク質を GtfA、同タンパク質をコードする DNA を gtfA ということがある。また、上記 (C) 又は (D) のタンパク質を ManC、同タンパク質をコードする DNA を manC ということがある。

本発明の DNA は、GtfA 及び ManC の両方をコードしていてもよい。

【0010】

本発明の DNA は、メチロフィラス属細菌、例えば、メチロフィラス・メチロトロファスの染色体 DNA から単離、取得することができる。メチロフィラス・メチロトロファスの野生株 AS1 株 (NCIMB No. 10515) は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア (National Collection of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Ltd., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom) から入手可能である。そしてこの株の一般的な培養方法は、NCIMB のカタログに記載されているが、また実施例に記載した SEII 培地でも生育させることができる。

【0011】

AS1 株のゲノム DNA は公知の方法により調製できるが、市販のゲノム調製用キットを使用してもよい。

本発明の DNA は、本発明によってそれらの塩基配列が明らかになったので、それらの塩基配列に基づいてプライマーを合成し、メチロフィラス属細菌等の細菌の染色体 DNA を鋳型とする PCR (ポリメラーゼ・チェーン・リアクション) により増幅することによって、取得することができる。また、前記塩基配列に基づいて調製したプローブ、又は PCR により増幅した部分断片をプローブに用いたコロニーハイブリダイゼーションによっても、本発明の DNA は取得され得

る。

【0012】

本発明のDNAのクローニングに用いるゲノムDNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断および連結、形質転換等の方法は、Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Third Edition (2001)に記載されている。

【0013】

上記PCRに用いるプライマーとしては、gtfAについては 配列番号5及び6、manCについては配列番号10及び11に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0014】

上記のようにして取得されたメチロフィラス・メチロトロファスのゲノムから単離されたgtfA及びmanCの塩基配列を配列番号1及び3に示す。また、それらによってコードされるGtfA及びManCのアミノ酸配列を配列番号2及び4に示す。

【0015】

上記GtfA及びManCのアミノ酸配列について、既知のデータベースの相同性検索を行った。その結果、GtfAは、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) のグリコシルトランスフェラーゼをコードすると思われる遺伝子産物 (Genbank DB accession No. D21242中のorf-14) と43%の相同性が認められた。尚、この相同性は、GtfAは81~467位、orf-14は84~467位の領域間で比較した。また、ManCは、エシェリヒア・コリのcpsB (manC) 遺伝子産物と56%の相同性が認められた。この相同性は、ManCは1~473位、cpsB産物は1~478位の領域間で比較した。相同性は、比較に用いた領域の全アミノ酸残基数に対する同一アミノ酸残基の個数の割合として算出した。

【0016】

本発明のDNAは、コードされるGtfA又はManCの活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入または付加を含んでいてもよい。ここで、数個とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構

造における位置や種類によっても異なるが、例えば、GtfA又はManCを構成するアミノ酸配列全体に対して、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同性を有し、GtfA又はManCの活性を有するものであってもよい。具体的には、前記「数個」は、好ましくは2~20個、より好ましくは2~10個である。前記GtfA又はManCの活性とは、具体的には多糖類を生成する活性であり、特に、GtfA活性は、GDP-ガラクトースのガラクトシル-1-リン酸部分を、ウンデカプレニルリン酸へ転移させるガラクトシル-1-リン酸トランスフェラーゼ（ガラクトシル-P-P-ウンデカプレニル合成酵素）活性であり、ManC活性は、マンノース-1-リン酸をGDP-マンノースに変化するマンノース-1-リン酸グアノシルトランスフェラーゼの活性をいう。

【0017】

上記のようなGtfA又はManCと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば、部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように配列番号1又は4に示す塩基配列を改変することによって取得することができる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、gtfA又はmanCをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、およびgtfA又はmanCを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくはEMS等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0018】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、gtfA又はmanCを保持する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異(mutant又はvariant)も含まれる。

【0019】

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現されたGtfA又はManCの活性を調べることにより、GtfA又はManCと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するgtfA又はmanCを保持する細胞から、例えば、gtfAの場合は、配列番号1の塩基番号4~1401からなる塩基配列を

有するDNA、または同塩基配列から調製され得るプローブと、manCの場合は、配列番号3の塩基番号4~410からなる塩基配列を有するDNA、または同塩基配列から調製され得るプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつGtfA又はManCのそれぞれの活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、GtfA又はManCと実質的に同一のタンパク質を、それぞれコードするDNAが得られる。

【0020】

ここでいう「ストリンジェントな条件」とはいわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0021】

プローブとしては、gtfAの場合はgtfAの一部の配列、manCの場合はmanCの一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、当業者によく知られた方法により、各遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、各遺伝子を含むDNA断片を鋳型とするPCR反応により作製することができる。プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は50℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

【0022】

なお、GtfAの活性は、Jiang, X.-M.ら (Molecular Microbiology, vol.5, p695-713に記載) の方法により測定できると考えられる。一方、ManCの活性の測定方法としては、例えば、Cabib, E. & Leloir, L.F. (Journal of Biological Chemistry, vol.231, p259-275参照) の方法が挙げられる。

【0023】

<2>本発明のメタノール資化性細菌

本発明の第一の細菌は、gtfA又はmanCが導入され、多糖類生成能が向上したメタノール資化性細菌である。gtfA及びmanCの両方が導入された細菌も、本発明の細菌に含まれる。

【0024】

また、本発明の第二の細菌は、gtfAもしくはmanC、又はこれらと相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、多糖類生成能が低下し、かつ、多糖類以外の目的物質の生産能を有するメタノール資化性細菌である。gtf及びmanC、又はgtf及びmanCのホモログの両方が破壊された細菌は、本発明の細菌に含まれる。

【0025】

本発明が適用されるメタノール資化性細菌としては、メタノールを主たる炭素源として生育することができる細菌であって、gtfA又はmanCが機能し得るか、あるいはgtfAもしくはmanC又はそれらのホモログを保持している細菌であれば、特に制限されない。具体的には、メチロフィラス・メチロトロファス (*Methylophilus methylotrophus*) 等のメチロフィラス属細菌、及び、メチロバチラス・グリコゲネス (*Methylobacillus glycogenes*)、メチロバチラス・フラゲラタム (*Methylobacillus flagellatum*) 等のメチロバチラス属細菌、メチロバクテリウム・イクストーケンス (*Methylobacterium extorquens*) 等のメチロバクテリウム属細菌が挙げられる。これらの中では、メチロフィラス属細菌が好ましく、メチロフィラス・メチロトロファスが特に好ましい。

【0026】

本発明の第一の細菌は、gtfA又はmanCを、これらがコードするGtfA又はManCが発現可能な形態でメタノール資化性細菌に導入することによって、構築することができる。メタノール資化性細菌にgtfA又はmanCを導入するには、メタノール資化性細菌細胞内で自律複製可能なベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターにgtfA又はmanCを連結して組換えDNAを作製し、それでメタノール資化性細菌メチロフィラス属細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。組換えDNAをメタノール資化性細菌へ導入するには、十分な形質転換効率を得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法 (Canadian

Journal of Microbiology, 43, 197, (1997)) が挙げられる。また、トランスダクション、トランスポゾン (Berg, D. E. and Berg, C. M., Bio/Technol. 1, 417, (1983))、Mu フェージ (特開平2-109985号) または相同組換え (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)) を用いた方法で、gtfA又はmanCを宿主染色体に組み込むこともできる。尚、必要に応じて、メタノール酸化性細菌内で機能するプロモーターを、gtfA又はmanCの上流に連結させてもよい。

【0027】

前記ベクターとして具体的には、宿主として使用するメタノール酸化性細菌、例えばメチロフィラス・メチロトロファス中で増殖できるプラスミドが使用される。例えば、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えば、pAYC32 (Chistoserdov, A.Y., Tsygankov, Y.D., Plasmid, 1986, 16, 161-167)、あるいはpMFY42 (Gene, 44, 53 (1990)) や、pBBR1及びその誘導体に由来するもの (Kovach, M.E., et al., Gene, 166, 175-176 (1995))、さらにはpRK310及びその誘導体に由来のもの (Edts. Murrell, J.C., and Dalton, H., Methane and methanol utilizers, Plenum Press, 183-206 (1992)) 等が利用できる。

【0028】

本発明の第二の細菌は、染色体上のgtfA又はmanC、又はこれらと相同組換えが起こり得る程度の相同性を有するホモログ (以下、単に「gtfA又はmanC」と記載することがある) を、これらの遺伝子産物が正常に機能しないように破壊することによって、構築することができる。前記相同組換えが起こり得る程度の相同性は、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。

【0029】

gtfA又はmanCが破壊されたメタノール酸化性細菌は、例えば、メタノール酸化性細菌を紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくはEMS等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、GtfA又はManCの活性が低下した変異株を選択する方法が挙げられる。

【0030】

また、実施例に示したように、相同性組換えを利用した遺伝子置換による方法 (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196(1985)) によっても、染色体上のgtfA又はmanCを破壊することができる。相同性組換えは、細菌が一般的に持つ能力であり、メチロフィラス属細菌も、相同組換えによる遺伝子置換が可能なことを、本発明者らは見出している。具体的には、正常な機能を有するGtfA又はManCを産生しないように改変したgtfA又はmanC (欠失型遺伝子) を含むDNAでメタノール資化性細菌を形質転換し、欠失型遺伝子と染色体上のgtfA又はmanCとの間で組換えを起こさせる。この後、染色体上のプラスミドが組み込まれた部位で再び組換えが起こると、プラスミドが染色体上から抜け落ちる。その際、組換えが起きる位置によって、欠失型遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちる場合と、正常な遺伝子が染色体上に固定され、欠失型遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちる場合がある。前者のような菌株を選択することにより、染色体上の正常な遺伝子が欠失型遺伝子で置換された菌株を取得することができる。

【0031】

前記欠失型遺伝子としては、コーディング領域の中の塩基配列中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることによってコードされるタンパク質の比活性が低下又は消失した遺伝子が挙げられる。また、コーディング領域の内部又は末端を欠失させた遺伝子、あるいは、コード領域に、他の配列を挿入した遺伝子等が挙げられる。他の配列としては、カナマイシン耐性遺伝子等のマーカー遺伝子が挙げられる。

【0032】

染色体上のgtfA又はmanCの発現を低下又は消失させることは、これらの遺伝子のプロモーター配列中に、1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせ、プロモーター活性を低下させることによって、転写レベルで遺伝子の発現を抑えること (M. Rosenberg and D. Court, Ann. Rev. Genetics 13 (1979) p.319、P. Youderian, S. Bouvier and M. Susskind, Cell 30 (1982) P.843-853参照) によっても行うことができる。

【0033】

また、これらの遺伝子の発現は、SD配列と開始コドンとの間の領域中に1つまたは複数の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることによって、翻訳レベルで抑えることができる (J. J. Dunn, E. Buzash-Pollert and F. W. Studier, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75 (1978) p.2743参照)。

【0034】

上記のようなプロモーターやSD配列と開始コドンとの間の領域の改変は、前記の遺伝子置換と同様に行うことができる。

遺伝子中に塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせるには、具体的には、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Methods in Enzymology, 154, 350(1987)) や、次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等の化学薬剤により処理する方法 (Shortle, D. and Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 270(1978)) が挙げられる。

【0035】

部位特異的変異法は、合成オリゴヌクレオチドを用いる方法であり、任意の限定された塩基対だけに、任意の置換、欠失、挿入、付加または逆位を導入できる手法である。この方法を利用するには、まず、クローン化され、DNA塩基配列が決定されている目的遺伝子を持つプラスミドを変性させて1本鎖を調製する。次に、変異を起こさせたい部分に相補的な合成オリゴヌクレオチドを合成するが、この時合成オリゴヌクレオチドを完全に相補的な配列にせず、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つようにしておく。その後1本鎖DNAと任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ合成オリゴヌクレオチドをアニールさせ、さらにDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントとT4リガーゼを用いて完全な2本鎖プラスミドを合成し、これをエシェリヒア・コリのコンピテントセルに導入する。このようにして得られた形質転換体の幾つかは、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位が固定された遺伝子を含むプラスミドを持っている。遺伝子に変異を導入し、改変または破壊することができる同様な手法には、リコンビナントPCR法 (PCR Technology, Stockton press(1989)) がある。

【0036】

本発明の第二の細菌は、L-リジン等のアミノ酸や、核酸、ビタミン類、酵素等のタンパク質等のような、多糖類以外の目的物質の生産能を有する細菌であることが好ましい。

上記のような細菌として、L-リジン生産能を有するメチロフィラス属細菌、例えばメチロフィラス・メチロトロファス菌株は、L-リジン生産能を有しない株に変異処理を施し、S-(2-アミノエチル)-L-システイン（以下、AECと記す）等のリジンアナログに対する耐性を付与することにより取得することができる。変異処理の方法としては、エシェリヒア・コリの菌体にNTGやEMS等の化学薬剤による処理、あるいは紫外線、放射線照射等の処理を施す方法がある。このような菌株の具体例としては、メチロフィラス・メチロトロファス AJ13608が挙げられる。本菌株は、メチロフィラス・メチロトロファスAS1株にAEC耐性を付与することによって育種されたものである。尚、メチロフィラス・メチロトロファスAJ13608は、1999年6月10日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM P-17416として寄託され、2000年3月31日付にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7112が付与されている。

【0037】

また、L-リジン生産能を有するメチロフィラス・メチロトロファス菌株は、L-リジンの生合成に関与する遺伝情報を担うDNAを遺伝子組換え技術により導入、増強することによっても育種することができる。導入される遺伝子は、ジヒドロジピコリン酸合成酵素、スクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ等、L-リジンの生合成経路上の酵素をコードする遺伝子であり、ジヒドロジピコリン酸合成酵素のようにL-リジンによるフィードバック阻害を受ける酵素遺伝子の場合には、かかる阻害が解除された酵素をコードする変異型遺伝子を用いることが望ましい。また、一方で、L-リジンの排出担体、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカムでのlysE遺伝子の導入も有効と思われる。

【0038】

目的遺伝子のメタノール資化性菌への導入は、前述のgtfA又はmanCの導入と同

様にして行うことができる。

目的物質生産能を有し、かつ、gtfA又はmanCが破壊されたメタノール資化性細菌は、gtfA又はmanCが破壊されたメタノール資化性細菌に目的物質生産能を付与することによって取得することができる。また、上記細菌は、目的物質生産能を有するメチロフィラス属細菌のgtfA又はmanCを破壊することによっても、取得することができる。

【0039】

<3>多糖類又は目的物質の製造方法

本発明の第一の細菌は、gtfA又はmanCが導入され、GtfA又はManCの活性が高められている。したがって、同細菌をメタノールを主要炭素源とする培地に培養し、同培地又は細菌細胞中に多糖類を生成、蓄積させ、同培地又は細胞から多糖類を採取することにより、多糖類を効率よく製造することができる。

【0040】

また、本発明の第二の細菌は、gtfA又はmanCが破壊され、多糖類、特に菌体外に分泌される多糖類の生成能が低下している。したがって、同細菌を培地に培養し、同培地又は細菌細胞中に目的物質を生成、蓄積させる際に、培地又は細胞中に生成する多糖成分量を低減させることができる。

【0041】

多糖類は、ゲル化剤や増粘安定剤などの産業応用があり、その安価製造法は期待されている。この観点から、本発明の第一の細菌は有用である。

一方で、メタノール資化性菌にて、例えばアミノ酸、核酸、ビタミン類、酵素類、タンパク質などの有用物質を目的物質として生産させる場合は、同細菌が副生する多糖類は不要産物となる。従って、副生多糖類を削減することは、その副生物の生産のために浪費されたエネルギーや炭素が、本来の目的産物の為に有効に利用でき、目的産物の生産性や収量が向上することが考えられ、産業的な応用において重要となる。また、培養液から菌体を遠心により除去する際などは、多糖を大量に生産している菌の場合、多糖が邪魔になり、菌体を沈めることが困難な場合がある。しかし、多糖生成量を減ずることで、遠心操作により、菌体を迅速に沈めることが可能となり、培養液からの菌体分離や培養液中から目的物質を

取得する際に、本発明の第二の細菌は有用である。

【0042】

上記多糖類としては、キサンタンガムなどが挙げられる。

メタノール資化性細菌の培養のために使用される培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養源を含有する通常の培地である。主要炭素源としては、メタノールであるが、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、でんぶん加水分解物などの糖類、グリセロール、ソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸、ピルビン酸等の有機酸類を併用して用いることができる。「メタノールを主要炭素源とする」とは、全炭素源のうち、メタノールを50%(w/w)以上、好ましくは80%(w/w)以上であることをいう。メタノールを炭素源として用いる場合の濃度は、通常は0.001%から4%(w/v)、好ましくは0.1%から2%(w/v)である。また、グルコース等を添加する場合の濃度は、通常、0.1%から3%(w/v)、好ましくは0.1%から1%(w/v)である。

【0043】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素源、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0044】

無機イオンとしては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。これらの他に、有機微量栄養源として、ビタミンB₁、または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい場合もある。

【0045】

培養は、好氣的条件下で16～72時間程度実施するのがよく、培養温度は25℃～45℃に、培養中pHは5～8に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、あるいはアンモニアガス等を使用することができる。

【0046】

培養終了後、発酵液中の多糖分量は、公知の方法、例えばフェノール硫酸法(Hodge, J.E., Hofreiter, B.T., Methods in Carbohydrate Chemistry, ed. by

Whistler, R.L., Wolfrom, M.L., Academic Press, New York, vol.1, p.388 (1962)) により測定することができる。

【0047】

培地又は菌体からの多糖類又は目的物質の採取は、公知の方法によって行うことができる。例えば、L-リジン等のアミノ酸の採取は、通常のイオン交換樹脂法、沈澱法等を組み合わせることにより適宜実施できる。

【0048】

【実施例】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明する。

【0049】

【実施例1】 gtfA (グリコシルトランスフェラーゼ) 遺伝子の取得

メチロフィラス・メチロトロファス (Methylophilus methylotrophus) AS1株 (NCIMB No.10515) を、50 mLのSEII 培地 (組成: K_2HPO_4 , 1.9g/L; $(NH_4)_2SO_4$, 5.0g/L; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 1.56g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2g/L; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.72mg/L; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 5 μ g/L; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 25 μ g/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 23 μ g/L; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 9.7mg/L; メタノール, 1%(v/v)) に植菌し、培養温度37℃にて一晩振とう培養した。その後、培養液を遠心し、菌体を回収した。得られた菌体から、市販のキット (Genomic DNA purification kit (Edge Biosystems社製)) を用いて、染色体DNAを精製した。

【0050】

次に、取得したゲノムDNA (0.05 μ g) を鋳型にして、DNAプライマーMgtfA-F1 (配列番号5) とMgtfA-R1 (配列番号6) を用いてPCRを行った。その条件は、変性94℃-10秒、アニーリング50℃-30秒、伸長反応70℃-4分であった (28サイクル)。PCRは、市販のキットPyrobest taq (Takara Bio Inc.社製) を、添付のプロトコールに従って使用した。その結果、約3.8kbpのDNA断片が増幅できた。そして、これを制限酵素PstIで消化し、2.2kbpのDNA断片を得た。

【0051】

一方、プラスミドベクターpBluescript SK- (Stratagene社製) を制限酵素PstIで消化し、DNA断片を調製した。以上の両DNA断片を、Ligation kit (Takara Bi

o Inc.) を用いて連結し、pBS-mGtfA1を作製した。なお、このプラスミド上でgtfA遺伝子の向きは、lacプロモーターからの転写の向きと同じ方向になっている。

【0052】

こうしてクローニングされたDNA断片の塩基配列を、常法に従って決定した。その配列を配列表配列番号1に、そして、それがコードするアミノ酸配列を配列表配列番号2に示した。このアミノ酸配列に相同な配列を、既存のアミノ酸配列データベースに対して検索したところ、クレブシエラ・ニューモニエのグリコシルトランスフェラーゼが見出されたため、この配列番号1の遺伝子をgtfAと命名した。

【0053】

【実施例2】メチロフィラス・メチロトロファスにおけるgtfA遺伝子の破壊とその効果

まず、プラスミドpUC4K (Amersham Biosciences社製) のKm^R (カナマイシン耐性) 遺伝子領域の両側に存在する制限酵素切断認識部位を一部改変した。すなわち、pUC4Kを制限酵素EcoRIとSalIで切断し切断面を平滑化した後、Km^R遺伝子DNA断片と複製開始領域 (Ori) が搭載されるDNA断片とを、Ligation Kit (宝酒造社製) により連結し、pUC4K2を作製した。つまり、pUC4K2は、pUC4Kから制限酵素部位EcoRI、BamHI、SalIが欠如させたものである。

【0054】

PCR用のDNAプライマーとして、Km4-F2 (配列番号7) とKm4-R2 (配列番号8) を作製し、鋳型DNAとしてpUC4K2を用いてPCR (条件: 変性94℃-10秒、アニーリング50℃-30秒、伸長反応70℃-1.5分、28サイクル) を行い、Km^R遺伝子が搭載されているDNA断片を増幅し、更に増幅されたDNAの両端をBKL kit (Takara Bio Inc.) で平滑端化した。

【0055】

次に、実施例1で取得したpBS-mGtfA1を制限酵素EcoT14IとMluIとで消化した後、平滑末端端処理を行い、DNA断片を調製した。そして、このDNA断片と上記のKm^R遺伝子DNA断片とをLigation kitにより連結し、pBS-MgtfA-Δを作製した。

【0056】

プラスミド pBS-MgtfA- Δ を制限酵素 BamHI と SalI とで切断し、カナマイシン耐性遺伝子で分断された gtfA 遺伝子 (gtfA::Km^R) を含む領域を断片化した。この断片をエタノール沈殿法にて濃縮し、更に脱塩処理を行い、これをエレクトロポレーションの導入 DNA 断片標品とした。

【0057】

一方、メチロフィラス・メチロトロファス AS1 株を SEII 液体培地（但しメタノール濃度は 0.5% (v/v)）で、37℃ で 16 時間振とう培養し、その培養液 20 ml を 10,000 rpm × 10 分間の遠心にかけて、菌体を集菌した。これに 1 mM HEPES (pH 7.2) 緩衝液 (20 ml) を加えて懸濁した後、遠心するという操作を 2 回を行い、最後に菌体に 1 ml の同溶液を加え、菌体懸濁液を調製し、エレクトロポレーション用のエレクトロセルとした。そして、上記のカナマイシン耐性遺伝子で分断された gtfA 遺伝子 (gtfA::Km^R) を含む DNA 断片の約 1 μ g 分を、エレクトロセル 100 μ l に加え、18.5 kV/cm, 25 μ F, 200 Ω の条件で電気パルスを与え、エレクトロポレーション処理を行い、DNA 断片を細胞内へ導入した。

【0058】

この菌懸濁液に直ちに SEII 液体培地を加え、37℃ で 3 時間培養した。その後、この培養液を SEII+Km 寒天培地 (20 μ g/ml のカナマイシンと 1.5% (w/v) の寒天を含む SEII 培地) に塗布し、37℃ で 3 日間培養することで、Km^R 株として約 100 株を得た。その中から 6 株を選び、ゲノム DNA を鋳型にして PCR (反応条件は、変性 94℃-10 秒、アニーリング 50℃-30 秒、伸長反応 72℃-4 分、30 サイクル) を行い、各候補株の gtfA 遺伝子領域の構造を調べた。なお、PCR に使用した DNA プライマーは、MgtfA-F1 (配列番号 5)、MgtfA-R1 (配列番号 6) と Km4-R1 (配列番号 9) である。その結果、予想どおり、MgtfA-F1 と MgtfA-R2 の組み合わせでは 4100 bp の大きさの DNA 断片、及び MgtfA-F1 と Km4-R1 の組み合わせでは 2900 bp の大きさの DNA 断片がそれぞれ増幅でき、破壊の標的遺伝子である gtfA 遺伝子の欠損株を取得できた。

【0059】

次に、この遺伝子欠損によって、菌体が産生する多糖成分の生成量が変化する

かどうかを調べた。AS1株とgtfA遺伝子欠損候補株を、SEII寒天培地へ塗り広げ、37℃で1晩培養したのち、培地表面約3cm²の菌体をかきとって、SEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃で35時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、その上清を菌体外多糖量測定のための試料とした。

【0060】

菌体外多糖量の測定は、中性糖、特にヘキソースに適用される比色定量法の一つであるフェノール硫酸法(参考文献:Dubois, M., K. A. Giles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356)を用いた。具体的には、試料0.2 mLに対し、5 %フェノール溶液を0.2 mL加えて混合した。次いで、濃硫酸1 mLを液面に直接滴下するように速やかに添加し、10分間放置した。その後、再び混合し、25℃の水浴中で20分間放置した後、490 nmの吸光度を吸光光度計(日立製U-2000)をで測定した。

【0061】

その結果、AS1株の菌体外多糖量は226 mg/Lであったのに対し、gtfA遺伝子欠損候補株では98 mg/Lであり、約半分にまで菌体外多糖量が減っていることが判明し、取得した株が、表現型としても多糖類生成の抑制株であることが解った。

【0062】

【実施例3】 manC (cpsB) (ホスホマンノース イソメラーゼ / マンノース-1-リン酸グアニリルトランスフェラーゼ) 遺伝子の取得

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株のゲノムDNA (0.05 µg) を鋳型にして、DNAプライマーmManC-F1 (配列番号10) とmManC-R1 (配列番号11) を用いて、PCRを行った。その条件は、変性94℃-10秒、アニーリング50℃-30秒、伸長反応70℃-4分であった(28サイクル)。PCRは、市販のキットPyrobest taq (Takara Bio Inc. 社製) を、添付のプロトコールに従って使用した。その結果、約1,460bpのDNA断片が増幅できた。そして、これを制限酵素BamHIで消化し、約1.46 kbのDNA断片を取得した。

【0063】

一方、プラスミドベクターpBR322 (Takara Bio Inc.) を制限酵素BamHIで消化

した後、切断端の5'リン酸を脱リン酸化した。これら2つのDNA断片をLigation kit (Takara Bio Inc.) を用いて連結し、pBR-MmanCを構築した。なお、このプラスミド中のmanC遺伝子の向きは、プラスミド中のAmp (アンピシリン) 耐性遺伝子の転写の向きと同方向である。

【0064】

この取得できたDNA断片の塩基配列を常法により決定した。その塩基配列を配列表配列番号3に、また、それがコードするアミノ酸配列を配列表配列番号4に示した。このアミノ酸配列に相同な配列を、既存のアミノ酸配列データベースに対して検索したところ、エシェリヒア・コリのmanC (cpsB) が見出されたため、この配列番号4の遺伝子をmanCと命名した。

【0065】

【実施例4】 manC遺伝子の破壊とその効果

PCR用のDNAプライマーとして、Km4-F2 (配列番号7) とKm4-R2 (配列番号8) を用い、鋳型DNAとしてpUC4K2を用いて、PCR (条件: 変性94℃-10秒、アニーリング50℃-30秒、伸長反応70℃-1.5分、28サイクル) を行い、Km^R遺伝子が搭載されているDNA断片を増幅した。増幅されたDNAの両端をBKL kit (Takara Bio Inc.) で平滑端化して、Km^R遺伝子を搭載したDNA断片 (1.3 kb) を調製した。

【0066】

次に、実施例3で取得したpBR-MmanCを制限酵素KpnIで消化し、平滑末端化処理を行い、切断端の5'リン酸を脱リン酸化した。このDNA断片と、上記のKm^R遺伝子を搭載したDNA断片とをLigation kitにより連結し、pBS-MmanC-Δを作製した。

【0067】

プラスミドpBS-MmanC-Δを制限酵素BamHIで切断し、カナマイシン耐性遺伝子で分断されたmanC遺伝子 (manC::Km^R) を含む領域を断片化した。この断片をエタノール沈殿法にて濃縮し、更に脱塩処理を行い、これをエレクトロポレーションの導入DNA断片標品とした。

【0068】

次に、実施例1、2と同様にして、AS1株に上記DNAサンプルをエレクトロポレ

ーションし、形質転換体を取得した。 Km^R 株として約100株が取得できた。その中から6株を選び、ゲノムDNAを鋳型にしてPCR（反応条件は変性94℃-10秒、アニーリング50℃-30秒、伸長反応 72℃-4分、30サイクル）を行い、各候補株のmanC遺伝子領域の構造を調べた。なお、PCRに使用したDNAプライマーは、MmanC-F2（配列番号12）とMmanC-R2（配列番号13）である。その結果、予想どおりMmanC-F2とMmanC-R2の組み合わせでは3900 bpの大きさのDNA断片が増幅でき、破壊の標的遺伝子であるmanC遺伝子の欠損株を取得できた。

【0069】

次に、この遺伝子欠損によって菌体が産生する多糖成分の生成量が変化するかどうかを調べた。実施例2と同様にフェノール硫酸法を用いた。

AS1株とmanC遺伝子の欠損候補株をSEII寒天培地に塗り広げ、37℃で1晩培養した後、培地表面約3cm²の菌体をかきとって、SEII生産培地（20ml）に植菌し、37℃で45時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、その上清を菌体外多糖量測定のための試料とした。

【0070】

その結果、AS1株の菌体外多糖量は475mg/Lであったのに対し、manC遺伝子欠損候補株では308mg/Lで、菌体外多糖量が減っていることが判明し、取得した株が、表現型としてもmanC破壊株であることが示唆された。

【0071】

以上のように、直鎖状DNAによる、メチロフィラス・メチロトロファスのmanC遺伝子破壊が確認された。

【0072】

【発明の効果】

本発明により、メチロフィラス属細菌の菌体外多糖生成に関わる遺伝子が提供される。この遺伝子を用いることで、菌体の多糖生成量を増加又は減少させることができる。

【0073】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> 多糖類生成に関与する遺伝子及びその利用

<130> P-B0649

<140>

<141> 2003-02-10

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1404

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1404)

<400> 1

atg gcg act aaa cct ccg atc aga aca ctc tcc ggc ttt tca tct ggc 48

Met Ala Thr Lys Pro Pro Ile Arg Thr Leu Ser Gly Phe Ser Ser Gly

1 5 10 15

ggg agt aat cca ctt tac atg ctt gag tct ctc gtt gag ccc ttg gtg 96

Gly Ser Asn Pro Leu Tyr Met Leu Glu Ser Leu Val Glu Pro Leu Val

20	25	30	
atg gtg ttt gtg ctg tgg ggg ttg ttt att tat acc gaa aac cgc att			144
Met Val Phe Val Leu Trp Gly Leu Phe Ile Tyr Thr Glu Asn Arg Ile			
35	40	45	
ccg atg tcg att ttt att aca tcg ata gtg ctg ttt tcg att tct ttc			192
Pro Met Ser Ile Phe Ile Thr Ser Ile Val Leu Phe Ser Ile Ser Phe			
50	55	60	
ccc agc ggc gcc aag att cgc aag ggc ttt gcc aag atg tgc cgg gat			240
Pro Ser Gly Ala Lys Ile Arg Lys Gly Phe Ala Lys Met Cys Arg Asp			
65	70	75	80
gtg att ggt caa tgg ctg gtc att gcc acc ttt ttg ctg acc ttt gct			288
Val Ile Gly Gln Trp Leu Val Ile Ala Thr Phe Leu Leu Thr Phe Ala			
85	90	95	
tat atc act cgt tac atc acc tta tat agc gaa aaa tta att ctc gcc			336
Tyr Ile Thr Arg Tyr Ile Thr Leu Tyr Ser Glu Lys Leu Ile Leu Ala			
100	105	110	
tgg ttg att gtg acg cca gtt gcc cag att att gcg ttg cag tta cta			384
Trp Leu Ile Val Thr Pro Val Ala Gln Ile Ile Ala Leu Gln Leu Leu			
115	120	125	
aaa tgg gcc agc ccc aaa ttg att gag tgg caa gga cca cga caa aac			432
Lys Trp Ala Ser Pro Lys Leu Ile Glu Trp Gln Gly Pro Arg Gln Asn			
130	135	140	
acc ttg att atc ggc ttg aat gag caa ggt ctg ctt ttg gcg gat aat			480
Thr Leu Ile Ile Gly Leu Asn Glu Gln Gly Leu Leu Leu Ala Asp Asn			
145	150	155	160
ctg aaa cgt gat tat tat caa aga atc aat ata ttg gga ttt ttt gag			528
Leu Lys Arg Asp Tyr Tyr Gln Arg Ile Asn Ile Leu Gly Phe Phe Glu			
165	170	175	
gac cgc gcg cct aac cgg ctt ccg cac ata gat tct tat ccg gta ctt			576

Asp Arg Ala Pro Asn Arg Leu Pro His Ile Asp Ser Tyr Pro Val Leu	
180	185
190	
ggc agc ttg aat gaa ctg agt cat tac ctg aaa tca cac act gta cac	624
Gly Ser Leu Asn Glu Leu Ser His Tyr Leu Lys Ser His Thr Val His	
195	200
205	
aaa ctt tat atc gct tta ccg atg tcc agt cac cct cgt att ttg aaa	672
Lys Leu Tyr Ile Ala Leu Pro Met Ser Ser His Pro Arg Ile Leu Lys	
210	215
220	
cta tta gac gat ctt aaa gac acg aca gct tcc att tac ttt gtg cct	720
Leu Leu Asp Asp Leu Lys Asp Thr Thr Ala Ser Ile Tyr Phe Val Pro	
225	230
235	240
gac atc ttt gtc acc gac ctg atc cag gga cgc gtt tcg gat gtc aac	768
Asp Ile Phe Val Thr Asp Leu Ile Gln Gly Arg Val Ser Asp Val Asn	
245	250
255	
ggc att cct gtt gtt tct gtg tgt gat acg cca ttt act ggc atg gat	816
Gly Ile Pro Val Val Ser Val Cys Asp Thr Pro Phe Thr Gly Met Asp	
260	265
270	
ggc ttt atc aaa cgc acg gca gat att tta ttt tca tta ttg gtg ttg	864
Gly Phe Ile Lys Arg Thr Ala Asp Ile Leu Phe Ser Leu Leu Val Leu	
275	280
285	
att ctg atc tcg cct att ttg atc ggt att gcg att gca gta aaa ctc	912
Ile Leu Ile Ser Pro Ile Leu Ile Gly Ile Ala Ile Ala Val Lys Leu	
290	295
300	
acc tct cct ggc ccc gtt att ttc aag caa cgt cgt tac ggc ttg gat	960
Thr Ser Pro Gly Pro Val Ile Phe Lys Gln Arg Arg Tyr Gly Leu Asp	
305	310
315	320
gga caa cag att ttg gtg tac aag ttc cgc tcc atg acc gtc act gaa	1008
Gly Gln Gln Ile Leu Val Tyr Lys Phe Arg Ser Met Thr Val Thr Glu	
325	330
335	

gat ggt gca acg gtg aca caa gcc acc agg aat gat caa cgc att acg 1056
Asp Gly Ala Thr Val Thr Gln Ala Thr Arg Asn Asp Gln Arg Ile Thr
340 345 350
cca ctg ggt gcc ttt ttg cgc aaa acc tcc ctg gat gag ttg ccg cag 1104
Pro Leu Gly Ala Phe Leu Arg Lys Thr Ser Leu Asp Glu Leu Pro Gln
355 360 365
ttt att aat gtg tta caa ggc cgc atg agt gtg gtt ggg cca cgc cca 1152
Phe Ile Asn Val Leu Gln Gly Arg Met Ser Val Val Gly Pro Arg Pro
370 375 380
cat gcg gtg gcg cat aac gag gaa tac cgt aag ctg att aaa ggc tat 1200
His Ala Val Ala His Asn Glu Glu Tyr Arg Lys Leu Ile Lys Gly Tyr
385 390 395 400
atg gta cgc cac aag gta aaa ccc ggg att acc ggc tgg gca cag gta 1248
Met Val Arg His Lys Val Lys Pro Gly Ile Thr Gly Trp Ala Gln Val
405 410 415
aat ggc ttc cgc ggc gaa acg gac acg tta gaa aaa atg gag caa cgt 1296
Asn Gly Phe Arg Gly Glu Thr Asp Thr Leu Glu Lys Met Glu Gln Arg
420 425 430
gtc cat tat gac ctt gag tac ctg cgc aac tgg agc cct cgc ttg gat 1344
Val His Tyr Asp Leu Glu Tyr Leu Arg Asn Trp Ser Pro Arg Leu Asp
435 440 445
atg ttg att gtc gcc aag acg ata tgg ctg acc att gtt ggt caa gat 1392
Met Leu Ile Val Ala Lys Thr Ile Trp Leu Thr Ile Val Gly Gln Asp
450 455 460
ggg gct tat tag 1404
Gly Ala Tyr
465

<210> 2

<211> 467

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 2

Met	Ala	Thr	Lys	Pro	Pro	Ile	Arg	Thr	Leu	Ser	Gly	Phe	Ser	Ser	Gly
1				5					10					15	
Gly	Ser	Asn	Pro	Leu	Tyr	Met	Leu	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Val
			20					25					30		
Met	Val	Phe	Val	Leu	Trp	Gly	Leu	Phe	Ile	Tyr	Thr	Glu	Asn	Arg	Ile
		35					40					45			
Pro	Met	Ser	Ile	Phe	Ile	Thr	Ser	Ile	Val	Leu	Phe	Ser	Ile	Ser	Phe
	50					55				60					
Pro	Ser	Gly	Ala	Lys	Ile	Arg	Lys	Gly	Phe	Ala	Lys	Met	Cys	Arg	Asp
65				70					75					80	
Val	Ile	Gly	Gln	Trp	Leu	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Leu	Leu	Thr	Phe	Ala
			85					90						95	
Tyr	Ile	Thr	Arg	Tyr	Ile	Thr	Leu	Tyr	Ser	Glu	Lys	Leu	Ile	Leu	Ala
		100					105						110		
Trp	Leu	Ile	Val	Thr	Pro	Val	Ala	Gln	Ile	Ile	Ala	Leu	Gln	Leu	Leu
		115					120					125			
Lys	Trp	Ala	Ser	Pro	Lys	Leu	Ile	Glu	Trp	Gln	Gly	Pro	Arg	Gln	Asn
	130					135					140				
Thr	Leu	Ile	Ile	Gly	Leu	Asn	Glu	Gln	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Asp	Asn
145					150				155					160	
Leu	Lys	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Ile	Asn	Ile	Leu	Gly	Phe	Phe	Glu
			165					170					175		
Asp	Arg	Ala	Pro	Asn	Arg	Leu	Pro	His	Ile	Asp	Ser	Tyr	Pro	Val	Leu
		180						185					190		

Gly Ser Leu Asn Glu Leu Ser His Tyr Leu Lys Ser His Thr Val His
195 200 205
Lys Leu Tyr Ile Ala Leu Pro Met Ser Ser His Pro Arg Ile Leu Lys
210 215 220
Leu Leu Asp Asp Leu Lys Asp Thr Thr Ala Ser Ile Tyr Phe Val Pro
225 230 235 240
Asp Ile Phe Val Thr Asp Leu Ile Gln Gly Arg Val Ser Asp Val Asn
245 250 255
Gly Ile Pro Val Val Ser Val Cys Asp Thr Pro Phe Thr Gly Met Asp
260 265 270
Gly Phe Ile Lys Arg Thr Ala Asp Ile Leu Phe Ser Leu Leu Val Leu
275 280 285
Ile Leu Ile Ser Pro Ile Leu Ile Gly Ile Ala Ile Ala Val Lys Leu
290 295 300
Thr Ser Pro Gly Pro Val Ile Phe Lys Gln Arg Arg Tyr Gly Leu Asp
305 310 315 320
Gly Gln Gln Ile Leu Val Tyr Lys Phe Arg Ser Met Thr Val Thr Glu
325 330 335
Asp Gly Ala Thr Val Thr Gln Ala Thr Arg Asn Asp Gln Arg Ile Thr
340 345 350
Pro Leu Gly Ala Phe Leu Arg Lys Thr Ser Leu Asp Glu Leu Pro Gln
355 360 365
Phe Ile Asn Val Leu Gln Gly Arg Met Ser Val Val Gly Pro Arg Pro
370 375 380
His Ala Val Ala His Asn Glu Glu Tyr Arg Lys Leu Ile Lys Gly Tyr
385 390 395 400
Met Val Arg His Lys Val Lys Pro Gly Ile Thr Gly Trp Ala Gln Val
405 410 415
Asn Gly Phe Arg Gly Glu Thr Asp Thr Leu Glu Lys Met Glu Gln Arg

420 425 430
 Val His Tyr Asp Leu Glu Tyr Leu Arg Asn Trp Ser Pro Arg Leu Asp
 435 440 445
 Met Leu Ile Val Ala Lys Thr Ile Trp Leu Thr Ile Val Gly Gln Asp
 450 455 460
 Gly Ala Tyr
 465

<210> 3

<211> 1422

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1422)

<400> 3

atg tct tta atg aaa att gtc ccc gtc att ttg tcc ggt ggt tct ggt 48
 Met Ser Leu Met Lys Ile Val Pro Val Ile Leu Ser Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 acg cga tta tgg ccg ttg tca cgc gcg gtt ttg cct aaa cag tta ttg 96
 Thr Arg Leu Trp Pro Leu Ser Arg Ala Val Leu Pro Lys Gln Leu Leu
 20 25 30
 cct ttg gtg acc gaa aat acg atg tta cag gag aca ttg atc cgg ctt 144
 Pro Leu Val Thr Glu Asn Thr Met Leu Gln Glu Thr Leu Ile Arg Leu
 35 40 45
 tct agc tgg gcg gat gtc ggt cat cct atc gtc gtc tgt ggt aac gat 192
 Ser Ser Trp Ala Asp Val Gly His Pro Ile Val Val Cys Gly Asn Asp

50	55	60	
cat cgc ttt ttg gtg gcg gag caa tta cgg caa gtg aat ttg aca cct	240		
His Arg Phe Leu Val Ala Glu Gln Leu Arg Gln Val Asn Leu Thr Pro			
65	70	75	80
gag gcg att gtg ctg gag ccg gtg gcg cga aat acg gca cct gcg att	288		
Glu Ala Ile Val Leu Glu Pro Val Ala Arg Asn Thr Ala Pro Ala Ile			
85	90	95	
gct gct gcg gct gtg act tta aaa gac aaa gat gtc ttg atg ctg gtg	336		
Ala Ala Ala Ala Val Thr Leu Lys Asp Lys Asp Val Leu Met Leu Val			
100	105	110	
ttg cct gcg gat cat gtg att act gac gtc act gct ttt gag gct gct	384		
Leu Pro Ala Asp His Val Ile Thr Asp Val Thr Ala Phe Glu Ala Ala			
115	120	125	
gtg cgt cgt gcc tgc gtt gca gca gag cag ggg aaa ctg gtc aca ttt	432		
Val Arg Arg Ala Cys Val Ala Ala Glu Gln Gly Lys Leu Val Thr Phe			
130	135	140	
ggt ata gag cct aca cag ccg gaa acc ggt tat ggt tat atc caa tca	480		
Gly Ile Glu Pro Thr Gln Pro Glu Thr Gly Tyr Gly Tyr Ile Gln Ser			
145	150	155	160
ggt gca gaa ttg gaa gca tgt gat ggt tgc ttt gaa gtg gca cgt ttt	528		
Gly Ala Glu Leu Glu Ala Cys Asp Gly Cys Phe Glu Val Ala Arg Phe			
165	170	175	
gtt gag aag cct gat gct gcg act gca cag caa tat ttg gat gcc gga	576		
Val Glu Lys Pro Asp Ala Ala Thr Ala Gln Gln Tyr Leu Asp Ala Gly			
180	185	190	
aac ttt tat tgg aac agc ggc atg ttt ttg ttt aaa ccg gct gtg ttc	624		
Asn Phe Tyr Trp Asn Ser Gly Met Phe Leu Phe Lys Pro Ala Val Phe			
195	200	205	
ctg gct gag ttg cag caa tac gcg cca gcc atg gtc agt gcg gta agc	672		

Leu Ala Glu Leu Gln Gln Tyr Ala Pro Ala Met Val Ser Ala Val Ser
 210 215 220
 aat gcc gtt gcg caa agt tat aaa gac ctg gat ttt gtg cgc ttg cat 720
 Asn Ala Val Ala Gln Ser Tyr Lys Asp Leu Asp Phe Val Arg Leu His
 225 230 235 240
 gag gcc tcg ttt gct gag tct cct tct gat tca att gac tat gcc gtc 768
 Glu Ala Ser Phe Ala Glu Ser Pro Ser Asp Ser Ile Asp Tyr Ala Val
 245 250 255
 atg gaa aaa acc aaa ctg gcg gcc gtg gta cct gcc agc atg ggg tgg 816
 Met Glu Lys Thr Lys Leu Ala Ala Val Val Pro Ala Ser Met Gly Trp
 260 265 270
 aat gat gtt ggc tca tgg act gcc tta aaa gaa gtg cag ccc aat gat 864
 Asn Asp Val Gly Ser Trp Thr Ala Leu Lys Glu Val Gln Pro Asn Asp
 275 280 285
 gcg gat ggg aat gct aca cgc ggg gat gtg ttt ctt aaa aat gtg aaa 912
 Ala Asp Gly Asn Ala Thr Arg Gly Asp Val Phe Leu Lys Asn Val Lys
 290 295 300
 aat acc ttg gta cgg gcg gaa gag cgc ttt gtg gct gcc gtt ggc gta 960
 Asn Thr Leu Val Arg Ala Glu Glu Arg Phe Val Ala Ala Val Gly Val
 305 310 315 320
 gag gat ttg ctg att gtt gaa acc agt gat gcg atc ctg gtt gcg cac 1008
 Glu Asp Leu Leu Ile Val Glu Thr Ser Asp Ala Ile Leu Val Ala His
 325 330 335
 cgt gat tgt gcg cag gat gtc aag aat att gtt gat cat ttg aag gca 1056
 Arg Asp Cys Ala Gln Asp Val Lys Asn Ile Val Asp His Leu Lys Ala
 340 345 350
 agc gga cgt tct gaa cat aag atg cat ccc cgt gtt tat cgc cct tgg 1104
 Ser Gly Arg Ser Glu His Lys Met His Pro Arg Val Tyr Arg Pro Trp
 355 360 365

ggt tgg tac gag gga atc gat atc ggc gag cgt ttc cag gtc aag cgt 1152

Gly Trp Tyr Glu Gly Ile Asp Ile Gly Glu Arg Phe Gln Val Lys Arg

370

375

380

att atg gtg aaa cca ggt gaa aga ttg tca ctg caa atg cat cat cat 1200

Ile Met Val Lys Pro Gly Glu Arg Leu Ser Leu Gln Met His His His

385

390

395

400

cgg gct gag cac tgg gtg gtt gtc agt ggg tct gcc atg atc act att 1248

Arg Ala Glu His Trp Val Val Val Ser Gly Ser Ala Met Ile Thr Ile

405

410

415

gat gat gtc acc aag ctc tat act gaa aac gaa tct act tat ata ccg 1296

Asp Asp Val Thr Lys Leu Tyr Thr Glu Asn Glu Ser Thr Tyr Ile Pro

420

425

430

att ggc tca acg cac cga cta gag aat cca ggt aaa ttg cct ttg cat 1344

Ile Gly Ser Thr His Arg Leu Glu Asn Pro Gly Lys Leu Pro Leu His

435

440

445

tta atc gag gtg caa tcc ggt agt tat ctt gga gaa gat gac atc gtg 1392

Leu Ile Glu Val Gln Ser Gly Ser Tyr Leu Gly Glu Asp Asp Ile Val

450

455

460

cgt ttt gaa gat acc tac ggc cgt agt tag 1422

Arg Phe Glu Asp Thr Tyr Gly Arg Ser

465

470

<210> 4

<211> 473

<212> PRT

<213> Methylophilus methylotrophus

<400> 4

Met Ser Leu Met Lys Ile Val Pro Val Ile Leu Ser Gly Gly Ser Gly

1	5	10	15
Thr Arg Leu Trp Pro Leu Ser Arg Ala Val Leu Pro Lys Gln Leu Leu			
20	25	30	
Pro Leu Val Thr Glu Asn Thr Met Leu Gln Glu Thr Leu Ile Arg Leu			
35	40	45	
Ser Ser Trp Ala Asp Val Gly His Pro Ile Val Val Cys Gly Asn Asp			
50	55	60	
His Arg Phe Leu Val Ala Glu Gln Leu Arg Gln Val Asn Leu Thr Pro			
65	70	75	80
Glu Ala Ile Val Leu Glu Pro Val Ala Arg Asn Thr Ala Pro Ala Ile			
85	90	95	
Ala Ala Ala Ala Val Thr Leu Lys Asp Lys Asp Val Leu Met Leu Val			
100	105	110	
Leu Pro Ala Asp His Val Ile Thr Asp Val Thr Ala Phe Glu Ala Ala			
115	120	125	
Val Arg Arg Ala Cys Val Ala Ala Glu Gln Gly Lys Leu Val Thr Phe			
130	135	140	
Gly Ile Glu Pro Thr Gln Pro Glu Thr Gly Tyr Gly Tyr Ile Gln Ser			
145	150	155	160
Gly Ala Glu Leu Glu Ala Cys Asp Gly Cys Phe Glu Val Ala Arg Phe			
165	170	175	
Val Glu Lys Pro Asp Ala Ala Thr Ala Gln Gln Tyr Leu Asp Ala Gly			
180	185	190	
Asn Phe Tyr Trp Asn Ser Gly Met Phe Leu Phe Lys Pro Ala Val Phe			
195	200	205	
Leu Ala Glu Leu Gln Gln Tyr Ala Pro Ala Met Val Ser Ala Val Ser			
210	215	220	
Asn Ala Val Ala Gln Ser Tyr Lys Asp Leu Asp Phe Val Arg Leu His			
225	230	235	240

Glu Ala Ser Phe Ala Glu Ser Pro Ser Asp Ser Ile Asp Tyr Ala Val
 245 250 255
 Met Glu Lys Thr Lys Leu Ala Ala Val Val Pro Ala Ser Met Gly Trp
 260 265 270
 Asn Asp Val Gly Ser Trp Thr Ala Leu Lys Glu Val Gln Pro Asn Asp
 275 280 285
 Ala Asp Gly Asn Ala Thr Arg Gly Asp Val Phe Leu Lys Asn Val Lys
 290 295 300
 Asn Thr Leu Val Arg Ala Glu Glu Arg Phe Val Ala Ala Val Gly Val
 305 310 315 320
 Glu Asp Leu Leu Ile Val Glu Thr Ser Asp Ala Ile Leu Val Ala His
 325 330 335
 Arg Asp Cys Ala Gln Asp Val Lys Asn Ile Val Asp His Leu Lys Ala
 340 345 350
 Ser Gly Arg Ser Glu His Lys Met His Pro Arg Val Tyr Arg Pro Trp
 355 360 365
 Gly Trp Tyr Glu Gly Ile Asp Ile Gly Glu Arg Phe Gln Val Lys Arg
 370 375 380
 Ile Met Val Lys Pro Gly Glu Arg Leu Ser Leu Gln Met His His His
 385 390 395 400
 Arg Ala Glu His Trp Val Val Val Ser Gly Ser Ala Met Ile Thr Ile
 405 410 415
 Asp Asp Val Thr Lys Leu Tyr Thr Glu Asn Glu Ser Thr Tyr Ile Pro
 420 425 430
 Ile Gly Ser Thr His Arg Leu Glu Asn Pro Gly Lys Leu Pro Leu His
 435 440 445
 Leu Ile Glu Val Gln Ser Gly Ser Tyr Leu Gly Glu Asp Asp Ile Val
 450 455 460
 Arg Phe Glu Asp Thr Tyr Gly Arg Ser

465

470

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer MgtfA-F1

<400> 5

ctgagtttgc ttgcctattg gatcactgct gcc

33

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer MgtfA-R1

<400> 6

cgccaaaatt cacaccaccg attctcagcg cat

33

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Km4-F2

<400> 7

cttgatatcg ctagctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggata

45

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Km4-R2

<400> 8

accaacgcgt aatcgcccca tcatccagcc agaaagtga

39

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Km4-R1

<400> 9

ttggtgattt tgaacttttg ctttgccacg gaacg

35

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer mManC-F1

<400> 10

ccggatccga tgcgtgtgcc tttagtc

27

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer mManC-R1

<400> 11

ccggatccca cctaactacg gccgtagg

28

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer mManC-F2

<400> 12

atttgaggtc ggtttgcttg cgctatttta acg

33

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer mManC-R2

<400> 13

tcgtgacata gcgttgcaca tagccctcat a

31

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 メタノール資化性細菌の多糖類生成に関与する遺伝子、及びその利用法を提供する。

【解決手段】 下記の(A)～(D)のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNAを用いて、メタノール資化性細菌の多糖類生成能を、向上又は低減させる。

(A) 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

(C) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

【選択図】 なし

特願 2003-032075

出願人履歴情報

識別番号

[000000066]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1991年 7月 2日

住所変更

東京都中央区京橋1丁目15番1号
味の素株式会社

2. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

2003年 5月12日

名称変更

住所変更

東京都中央区京橋1丁目15番1号
味の素株式会社